

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Navazující Ekologie



Bc. Jan Ehl

Reverze pohlaví u ještěra s genotypově určeným pohlavím (Squamata: Acrodonta:

***Pogona vitticeps*)**

Sex reversion in the lizard with genotypic sex determination (Squamata: Acrodonta:

Pogona vitticeps)

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 08. 2015

Podpis

Poděkování

Zde bych velmi rád poděkoval svému školiteli Lukáši Kratochvílovi za záštitu při studiu, jeho trpělivost, cenné rady a věcné připomínky při psaní diplomové práce. Také bych velice rád poděkoval Jasně Vukić za pomoc s metodou PCR a Lukáši Kubičkovi za konzultace ohledně aplikace hormonů a za pomoc s operacemi zvířat. Velký dík patří i Janu Červenkoví za cenné chovatelské rady a nezištnou pomoc v mnohých záležitostech. Tarasu Ardanovi musím poděkovat za jeho významnou a rychlou pomoc při histologickém určování gonadálního pohlaví. Tereze Schořálkové děkuji za praktické seznámení s aplikací hormonů. Nakonec, děkuji především své rodině za jejich nejen finanční, ale především morální a psychickou podporu a své přítelkyni za pomoc s péčí o zvířata a za to, že je mi vždy oporou.

Tento diplomový projekt byl finančně podpořen grantem GA UK 1336314 „Reverze pohlaví u ještěra s genotypově určeným pohlavím (Acrodonta: *Pogona vitticeps*)“

Abstrakt

Určení pohlaví u plazů je napříč jejich skupinami velice rozmanitou záležitostí. Setkáváme se zde jak s teplotně určeným pohlavím, tak s genotypově určeným pohlavím a s mnoha nezávislými přechody mezi nimi. Je to skupina vhodná ke studiu evoluce determinace pohlaví, pohlavních chromozomů a pohlavně determinačních genů.

V nedávné době začaly být u plazů hlášeny občasné reverze pohlaví způsobené hormonálně či extrémní inkubační teplotou. U akrodontního ještěra *Pogona vitticeps* byla ohlášena reverze pohlaví za pomoci vysokých teplot. Naším cílem bylo experiment zopakovat především vzhledem k nedostatečnosti některých metod potvrzení reverze. Také bylo v plánu, celý experiment rozšířit o hormonální reverzi, studium perzistence reverze do dospělosti a plodnosti revertovaných jedinců.

Podařilo se nám reverzi pohlaví způsobenou vysokou inkubační teplotou věrohodně prokázat za pomoci histologického vyšetření gonád. Také hormonální indukce reverze pohlaví se ukázala jako účinná. Do jednoho roku odchovaní jedinci s nesouhlasným fenotypovým a genotypovým pohlavím, stvrzují stálost této reverze. Naše výsledky se shodují s recentní prací zabývající též reverzí u tohoto ještěra. Zdá se tedy, že reverze pohlaví může být u plazů plně funkční záležitostí a její bližší studie, by mohla přispět k pochopení evoluce určení pohlaví.

Klíčová slova: evoluce determinace pohlaví, reverze pohlaví, teplotně určené pohlaví, genotypově určené pohlaví, pohlavní chromozomy, *Pogona vitticeps*, estradiol

Abstract

Sex determination among reptiles is a very variable matter across its taxa. We meet there temperature sex determination and genotypic sex determination with many independent transitions between them. It is a group suitable to study evolution of sex determination, sex chromosomes and sex determination genes.

Rare cases of sex reversal caused by extreme incubation temperature or exogenous hormones have been reported in recent years. In case of Acrodont lizard, *Pogona vitticeps*, was reported sex reversal caused by high incubation temperatures. Our purpose was to repeat the experiment, mainly due to insufficient conclusiveness of used methods. We wanted to expand the experiment by hormonal reversal, studying persistence of sex reversal to maturity and fertility of reversed individuals.

We managed successfully to demonstrate sex reversal in both treatments by histological examination. Individuals with discordant phenotypic and genotypic sex were breed till one year of life, which demonstrate persistence of reversal. Our outcomes are concordant with most recent work on this species and show full functional phenomenon of sex reversal with reptiles, which studying could contribute to our understanding of evolution of sex determination.

Key words: evolution of sex determination, sex reversal, temperature sex determination, genotypic sex determination, sex chromosomes, *Pogona vitticeps*, estradiol

1 OBSAH

2	Úvod	8
2.1	Determinace pohlaví	8
2.2	Teplotně určené pohlaví.....	9
2.3	Genotypově určené pohlaví a gonozomy.....	10
2.4	Determinační geny	11
2.5	Reverze pohlaví	12
3	Zaměření diplomové práce.....	14
4	Metodika	15
4.1	Teplotní reverze.....	15
4.2	Hormonální ošetření.....	16
4.3	Pitvy	17
4.4	Histologie	17
4.5	PCR.....	17
4.6	Operace	18
4.7	Modelový druh a jeho chov.....	19
5	Výsledky.....	21
5.1	Kontrola genotypového určení pohlaví	21
5.2	Histologické potvrzení reverze	21
5.3	Odchov teplotně revertovaných jedinců	23
5.4	Hormonální odchovy	24
6	Diskuse.....	25
6.1	Zhodnocení práce	25
6.2	Co zjistili jiní a na co poukazují	25
6.3	<i>P. vitticeps</i> : výjimka či pravidlo?.....	27
6.4	Kudy dál	29
7	Závěr	30
8	Literatura	31

2 ÚVOD

2.1 DETERMINACE POHLAVÍ

Otázka týkající se determinace a diferenciací pohlaví zajímá lidstvo již odedávna. Nejen, že napříč různými kulturami jsou stále preferováni potomci určitého pohlaví, například v rámci udržení populace, či náboženských a jiných kulturních důvodů (Arnold & Kuo 1984). Ale upřednostnění pohlaví je využito i v živočišné produkci – například manipulace poměru pohlaví u tura domácího ku prospěchu býčků pro masnou produkci (Garner et al. 2008). Dnes již víme, že pohlaví obratlovců je determinováno buď genotypem (*genotypic sex determination* - dále již GSD), anebo prostředím (*environmental sex determination* - dále již ESD). Ve druhém případě nejsou pohlavní chromozomy vyvinuty a o pohlaví nejčastěji rozhoduje teplota inkubace vajec (*temperature sex determination*, TSD) jako je tomu u řady plazích linií (Valenzuela 2004) nebo také například interakce jedinců v populaci u některých ryb (Iwata et al. 2008). Z toho vyplývá, že způsob určení pohlaví je poměrně variabilní záležitostí a v různých živočišných liniích může být a také je různé.

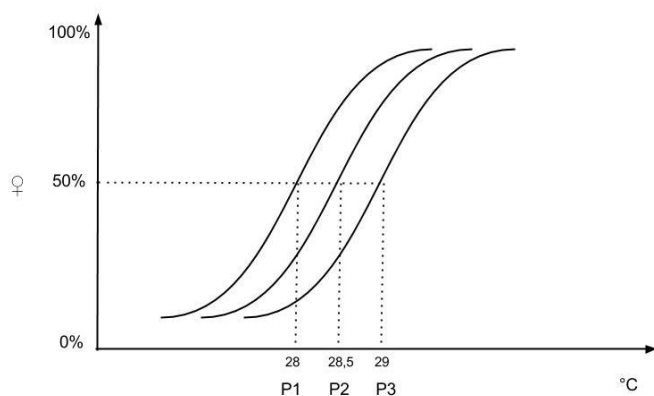
Pohlavní chromozomy člověka a ostatních živorodých savců jsou již dosti starou záležitostí, neboť jejich stejný původ sahá k vačnatcům (zatímco ptakořitní mají značně odvozený systém pohlavních chromozomů) a jejich identita je napříč živorodými savci velice stabilní (shrnutí v Waters et al. 2007). Samozřejmě ale i zde nacházíme výjimky – jako je např. XO systém u krysy z rodu *Tokudaia* a slepušek (shrnutí v Fredga 1983). Podobně značně stabilní pohlavní chromozomy mají ptáci (Shetty et al. 1999).

Co se týká ostatních linií plazů, jsou mezi nimi pohlavní chromozomy různého původu a dokonce určení pohlaví jako takové je rozmanitou záležitostí (Pokorná & Kratochvíl 2009). Když to vezmeme postupně podle hlavních linií, recentní druhy krokodýlů a haterií vykazují znaky TSD a gonozomy u nich nebyly nalezeny (Mitchell et al. 2006, Lang & Andrews 1994). Mnohé linie želv jsou na tom podobně jako krokodýli, avšak setkáváme se zde již i s nezávislými přechody ke GSD (Ewert et al. 1994, Martinez et al. 2008). U šupinatých plazů je nezávisle vzniklé GSD mezi liniemi mnohem častější než u želv (Valenzuela 2004). Pravděpodobně ancestrální TSD přetrvává u některých skupin agam a u značně variabilních a druhově bohatých gekonů (Gamble et al. 2015, Pokorná & Kratochvíl 2014).

2.2 TEPLTNĚ URČENÉ POHLAVÍ

Inkubace vajec může probíhat jen v určitém rozmezí teplot, ve kterém se embryo zdárně vyvíjí, je to tzv. viabilní rozmezí. Také by chtělo podotknout, že o vývoji jednoho či druhého pohlaví je u druhu s TSD rozhodnuto během vcelku krátkého úseku inkubace zvaného teplotně senzitivní perioda (temperature sensitive period - TSP, Mrosovsky & Pieau 1991). Poloha i délka TSP se může s inkubační teplotou i mezidruhově lišit, avšak většinou platí, že se nalézá ve druhé třetině inkubační doby. Nejen, že každý druh má tato rozmezí teplot (viabilní i TSP) jinak široké či posunuté, ale jsou zde dokonce rozdíly v tom, jaké pohlaví se líhne při které teplotě. Například u druhu *Crocodylus niloticus* se při nízkých teplotách líhnou samice a při vysokých samci (typ *female-male*, Hutton 1987). Obráceně je tomu například u želvy *Trachemys scripta* (typ *male-female*, Bull et al. 1982). Jinou možností je rozdělení na viabilního rozmezí na jednu středovou a dvě krajní části. Například u gekončíka *Eublepharis macularius* se samice líhnou v obou krajních teplotách a samci v teplotách středových (typ *female-male-female*, Viets et al 2005). Mezi plazy není známá, avšak u ryby *Menidia menidia* (Conover et al. 1992) je popsána situace opačná, kdy se v okrajových, nízkých i vysokých teplotách vyvíjejí samci.

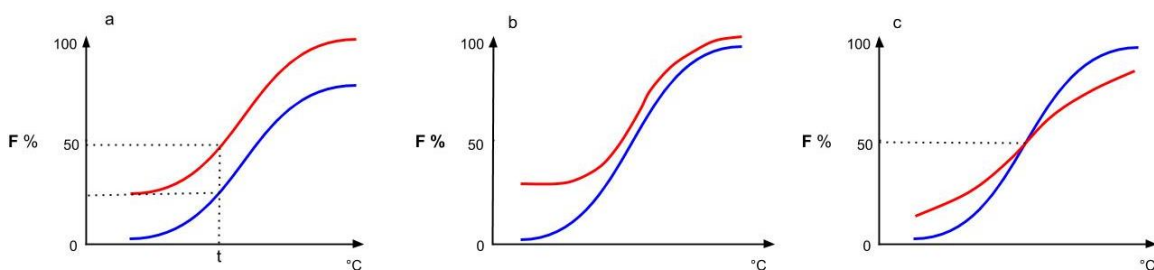
Přechody mezi teplotami produkujícími opačné pohlaví nejsou ostré, a proto teplota (či její rozmezí), při které je poměr pohlaví vyrovnaný (1:1), je nazývána zlomová teplota (*pivotal temperature*, Mrosovsky & Pieau 1991). Toto však platí jen pro inkubaci vajec při konstantní teplotě a tedy v péči člověka. Takto kontrolované inkubační experimenty se stabilní teplotou nám umožňují pozorovat a porovnávat odlišné varianty TSD a různé i vnitrodruhové posuny inkubačních teplot. Například mohou být odhaleny rozdíly ve zlomové teplotě či v celkovém viabilním rozmezí teplot mezi jednotlivými populacemi druhu (Obr. 1).



Obr. 1 Posun zlomové teploty

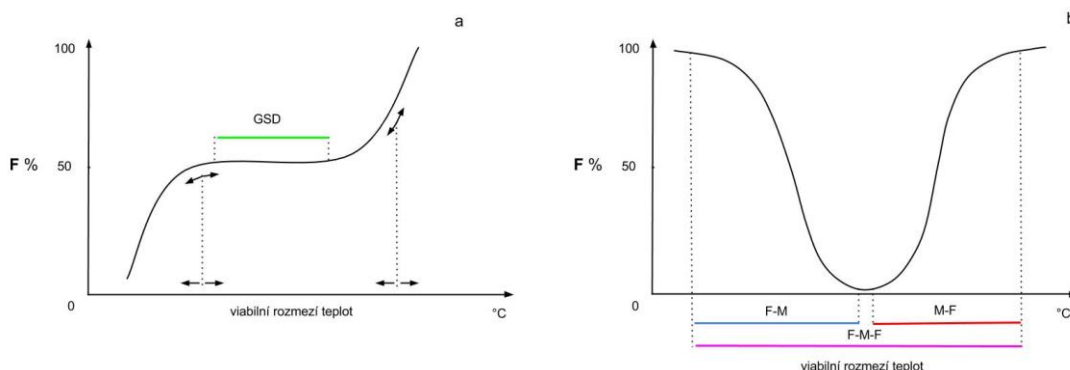
P1, P2 a P3 jsou tři různé zlomové teploty, které však původně vyšly ze stejného bodu. Lze si představit adaptaci druhu na změny v prostředí právě takovýmto posunem zlomové

Možné jsou i další evoluční změny závislosti poměru pohlaví na teplotě. Mezi ně lze z pohledu křivky zahrnout změnu jejího sklonu, jinou počáteční hodnotu či obyčejné posunutí (Obr. 2).



Obr. 2 Posuny v TSD módu: a) posunem křivky např. změnou citlivosti determinačního genu k teplotě b) změna počátku křivky např. zvyšující se uplatnění determinačního genu c) změna sklonu křivky např. skrytou genetickou variabilitou

Tyto posuny se snad nedají vysvětlit jinak nežli genetickou variabilitou. Dokonce je možné si tyto podtypy TSD představit jako úpravu jediného ancestrálního módu determinace pohlaví (Obr. 3).



Obr. 3 Posunuí viabilního prostředí umožní a) odhalení citlivosti GSD druhu k extrémním teplotám b) umožní přeskoky mezi jednotlivými módy TSD

2.3 GENOTYPOVĚ URČENÉ POHLAVÍ A GONOSOMY

GSD se u plazů vyvinulo pravděpodobně mnohokrát nezávisle (Pokorná & Kratochvíl 2009). O různém původu pohlavních chromozomů svědčí i rozdílná heterogamie. Kromě ptáků je heterogametickým pohlavím samice (ZW) například u korovců (Pokorná et al. 2014), varanů (King & King 1975, Matsubara et al. 2014), ještěrek (podle prací v Olmo & Signorino 2005), agam (Ezaz et al. 2009) a některých rodů gekonů (Koubová et al. 2014, Pokorná et al. 2014). Nově objevené chromozomy se samičí heterogamii jsou i u chameleonů (Rovatsos et al. 2015). Se samčím heterogametickým pohlavím (XY) se setkáváme u některých gekončků (Pokorná

et al. 2010), tejuvitých a scinků (shrnutí v Pokorná & Kratochvíl 2009) a želv (Martinez et al. 2008). Překvapivě velmi stabilní a homologické pohlavní chromozomy XY byly nalezeny u leguánů (Rovatsos et al. 2014).

Podle obecně uznávané hypotézy se pohlavními chromozomy může stát kterýkoli pár autozomů. Záleží patrně jen na predispozici ke vzniku pohlavně determinačního genu, například z genů podílejících se na diferenciaci gonády, a jeho umístění na jeden chromozom z tohoto páru. Geny přebírající od vlivů z okolí zodpovědnost za určení pohlaví vytvoří z jednoho autozomálního páru chromozomů, na kterém se nalézají, gonozomy. Pohlavními chromozomy se může stát v podstatě kterýkoli pár autozomů. Záleží patrně jen na predispozici ke vzniku nových pohlavně determinačních genů, například z genů podílejících se na diferenciaci gonády, nebo jiných skutečnostech, které vedou k umístění těchto genů na určitý pár, kupříkladu na translokaci odjinud (Graves & Peichel 2010).

Pohlavní chromozomy se po svém vzniku nejen mohou nadále vzdalovat od své původní podoby, ale je předpokládáno, že se především začnou odlišovat jeden od druhého. Pohlavně výhodné vlohy se potom váží na chromozom typický pro pohlaví, pro něž jsou výhodné, a naopak se vázat nebudou na chromozomu, pro jehož pohlaví jsou nevýhodné. Jedná se například o geny zásadní pro vývoj jedné či druhé gonády. Takto navázané geny vyžadují i redukovanou rekombinaci mezi gonozomy (Nei 1969) alespoň v některých úsecích, což dále přispívá k rozrůznění chromozomů, nakonec i morfologicky (Charlesworth et al. 2005). Podle toho zda se pohlavní chromozomy již morfologicky odlišují, dají se dělit na homomorfní a heteromorfní. Z tohoto scénáře vyplývá jednoduchý předpoklad, že heteromorfní chromozomy jsou starší než homomorfní, což však nemusí vždy platit. Například druh *Anolis carolinensis* vlastní gonozomy již dosti staré, X a Y jsou sekvenčně odlišné, přesto je nelze morfologicky odlišit (Alföldi et al. 2011, Rovatsos et al. 2014). Naopak značně heteromorfní neo-pohlavní chromozomy nemusí být zdaleka tak staré (Pokorná et al. 2010).

2.4 DETERMINAČNÍ GENY

Geny determinující pohlaví jsou mezi amniotickými obratlovci dobře popsány snad jen u savců a ptáků. Mimo Amniota jsou prozkoumány u modelových organismů jako např. octomilky (Bell et al 1988) či háďátka (Schedl et al. 1988). O pohlaví u drtivé většiny živořodých savců

rozhoduje přítomnost či absence chromozomu Y s genem SRY, který působí přímo na spuštění diferenciační kaskády směrem k varlatům (Koopman et al. 1991).

Docela jiný mechanismus determinace pohlaví se vyvinul u ptáků. Pohlaví determinující gen DMRT1 zde sedí na chromozomu Z (tedy párovém pohlavním chromozomu), který v případě jeho dvou kopií v organismu (ZZ) způsobí vývoj samčího pohlaví (Smith et al. 2009). O tom, zda se zárodek vyvine v samce, tedy nerozhoduje pouhá přítomnost, ale množství kopií genu (genová dávka).

Hledání takovýchto genů, které mají na svědomí senzitivitu k teplotě u TSD druhů, nebo které by byly zodpovědné za determinaci pohlaví u druhů s GSD, u ostatních plazů zatím nedospěla k žádnému jednoznačnému výsledku (shrnuje Shoemaker et al. 2009). Hlavními adepty však zůstávají geny patřící do gonadální diferenciační kaskády (*AMH* gen, *Dax1*, *Dmrt1*, *FoxL2*, *Sf1*, *Sox9*, *WT1*, *Rspo1* a další; Shoemaker et al. 2009, Rhen et al. 2015). Slibný postup k testování těchto a jiných kandidátních genů byl navržen a demonstrován v práci Rhen et al. (2015). Pomocí přesunů vajec během inkubace mezi samce a samice indukující teplotou (a opačným směrem) lokalizovali TSP u želvy druhu *Chelydra serpentina* a poté pomocí nejnovějších metod sledovali expresi faktorů podílejících se na diferenciaci gonády embrya.

2.5 REVERZE POHLAVÍ

Zajímavým tématem, které částečně dokládá rozrůznění chromozomů a jejich specializaci pro jedno či druhé pohlaví a jímž se zabývá nejedna studie, je reverze pohlaví. Reverze je v podstatě děj, při kterém se vyvíjí pohlaví opačné než by podle genotypu daného jedince mělo. Vzniká tedy jedinec s nesouhlasným genotypem a fenotypem, jako například XY samice či XX samec. K takovému výsledku může vést hned několik příčin. U savců, kde jsou tyto děje asi nejčastěji studovány, k tomu dochází především třemi způsoby. Prvním je mutace genů na Y chromozomu či přímo v genu SRY, která ho učiní nefunkčním. V takovém případě se u lidí jedinec XY vyvíjí jako žena, avšak s dysplasií vaječníků, podobně jako je tomu u Turnerova syndromu (Hawkins et al. 1992). Dalším důvodem tentokrát uměle navozené reverze je cílená inaktivace některého z genů z pohlavně diferenciační kaskády (tzv. *gene knockout*). I zde proběhne pohlavní reverze vedoucí k neplodnosti či jinému postižení revertovaného jedince (Cui et al. 2004). K reverzi pohlaví ve směru samice-samec může dojít díky inzerci pohlaví determinujícího úseku z chromozomu Y na chromozom X (Bishop et al. 2000). Tyto práce

naznačují, že pohlavní chromozomy savců jsou již natolik specializovány na jedno pohlaví, že k reverzím sice docházet může, ale revertování jedinci jsou zpravidla neplodní.

U plazů tomu tak však být nemusí. U australského horského scinka se samčí heterogamii *Bassiana duperreyi*, byla dobře prozkoumána a potvrzena reverze pohlaví. Reverze směrem k XX samcům byla způsobena nízkými inkubačními teplotami a pro opačný směr, kdy vznikaly XY samice, bylo použito exogenního estradiolu (Radder et al. 2008). Především stálost takovýchto reverzí byla demonstrována u dvou želv z rodu *Staurotypus* (Freedberg et al. 2006). Dále byl podobný fenomén studován u šupinatého ještěra z čeledi Agamidae, *Pogona vitticeps*, kde byla objevena reverze pohlaví za pomoci vysoké inkubační teploty. U tohoto druhu se samčí heterogamii (ZW systém) vysoké inkubační teploty způsobují vývoj ZZ samic (Quinn et al. 2007). Zde však nebyla dokumentace zdaleka tak dobrá jako v předchozím případě. Fertilita revertantů u plazů však nebyla doposud studována.

Tyto záznamy o reverzi pohlaví se staly nadějí pro studium přeskoků od TSD k GSD a popřípadě naopak. Hypotéza GSD jako evoluční pasti předpokládá, že zpětný přeskok od GSD zpět k TSD není možný, a pokud tak jen v případě mladých a nediferencovaných pohlavních chromozomů (Pokorná & Kratochvíl 2014). Druhu se časem uzavře možnost návratu k určení pohlaví pomocí inkubační teploty. Nenachází zde žádné výhody ke zpětnému přeskoku k TSD, kde může být často dost nevyrovnaný poměr pohlaví. Dále po určité době a nastřádání pohlavně specifických alel již revertant, jedinec nesouhlasného genotypového a fenotypového pohlaví, který je pro přeskok k TSD nezbytný, začíná být neplodný nebo alespoň méně fertilní než jedinec, který má pro svůj fenotyp správný, výhodný genetický podklad. Revertovaný jedinec by tedy musel mít zdatnost vyšší nebo alespoň stejnou jako jedinec nerevertovaný. Pokud však druh, který byl považován za nositele již stabilních (starých) či dokonce heteromorfních pohlavních chromozomů, vytváří plodné a i jinak zdatné revertované jedince, znamenalo by to, že hypotéza GSD jako evoluční pasti něco přehlíží a bude potřeba se na toto téma více zaměřit.

3 ZAMĚŘENÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Naše studie se měla pokusit o zopakování a rozšíření experimentu zkoumajícího reverzi pohlaví u agamy druhu *Pogona vitticeps*, kterým se zabývala práce Quinn et al. (2007). Tato práce, přestože byla publikovaná v prestižním časopise Science, má značné metodologické mezery. Způsobu osexování mláďat lze vyčíst důležitý nedostatek - nebylo provedeno histologické vyšetření gonády (gonáda byla určena pouze podle tvaru a velikosti). Recentní práce však jasně dokládá u teplotně a hormonálně manipulovaných embryí želvy s TSD, že inkubační teplota určuje morfologii gonády bez ohledu na její vnitřní uspořádání. Varlata indukovaná hormonální manipulací při teplotě normálně plodící samičí pohlaví mají morfologii ovárií a naopak ovaria produkovaná aplikací estrogenu při teplotě plodící samce mají morfologii varlat (Matsumoto & Crews 2012). Histologické vyšetření gonády je tedy naprosto nezbytné k determinaci fenotypového pohlaví gonády. Mimo to bylo pohlaví mláďat určeno pouze těsně po vylíhnutí a není tedy známa stálost reverze (efekt genotypu by při další ontogenezi mohl převážit nad environmentálně indukovanou výchylkou).

Záměrem bylo též celý experiment rozšířit o reverzi za pomoci hormonů. Změna pohlaví by byla v tomto případě indukována použitím hormonu estradiolu (dále již E2) indukujícího reverzi například u výše zmíněného scinka nebo u některých druhů želv jak s TSD tak GSD (Merchant-Larios et al. 1997, Freedberg et al. 2006). Vzhledem k předpokladu totožnosti diferenciačních kaskád hormonální a teplotní reverze, bylo v plánu toho dosahovat v totožném směru jako při vysokých teplotách a to ze samce na samici. Této podobnosti odpovídá snižování k reverzi potřebných dávek E2 u teplot blížících se teplotě zajišťující 100 % samic (Wibbels et al. 1991). Také TSP odpovídá dobře, kdy je embryo sensitivní i k estradiolu (Merchant-Larios et al. 1997). Nejen tedy, že by hormonální reverze měla probíhat podobnými cestami jako reverze teplotní, ale mělo by to jít snáze (není potřeba senzitivita kaskády k teplotě) a bez možných vedlejších účinků extrémních teplot.

Co se týče významu reverze, kolektiv Quinn et al. (2007) argumentuje, že pokud tedy má tato agama smíšený systém určení pohlaví (prvky GSD i TSD), mohlo by se z tohoto systému vyvinout TSD. Nedokládají však, jakým způsobem by se v takovémto systému udržovaly dlouhodobě diferencované pohlavní chromozomy. Více druhů agam rodu *Pogona* i příbuzného rodu sdílejí pohlavní chromozomy ZZ/ZW homologické s *P. vitticeps* (Quinn et al. 2009), což nasvědčuje evoluční stabilitě způsobu určení pohlaví u této skupiny. Naskýtá

se tedy možnost, že extrémní teploty u tohoto ještěra sice vedou k reverzi pohlaví, revertování jedinci však mohou mít malou, případně nulovou zdatnost a nemůžou vést k zafixování či udržení TSD strategie. Mohlo by se tedy jednat pouze o maladaptivní vliv teploty. Nízké zdatnosti revertovaných jedinců by u těchto druhů nasvědčovala sterilita revertovaných jedinců u jiných linií s dobře diferencovanými pohlavními chromozomy zmíněná výše. Za úvahu též stojí, že tito jedinci mohou mít nedovyvinuté některé sekundární pohlavní znaky, protože jim chybějí pohlavně-specifické části genomu (pohlavní chromozomy), na které mohou být tyto znaky navázány. Případně by mohli mít revertování jedinci nižší zdatnost způsobenou ontogenezí v extrémních podmínkách, například u gekona *Coleonyx elegans* bylo doloženo, že extrémní inkubační teplota vede k pozmeněnému behaviorálnímu fenotypu (Trnik et al. 2011). Zdatnost pohlavních revertantů u plazů však dosud nebyla testována. Považujeme tedy za důležité experiment zopakovat a rozšířit a tím pomoci k posouzení stability GSD vůči teplotním pohlavním revertantům.

4 METODIKA

4.1 TEPLOTNÍ REVERZE

Dle Quinn et al. (2007), by reverze pohlaví způsobená vysokou inkubační teplotou měla probíhat již při 34 °C, avšak s nízkým zastoupením. Horní hranice, nad kterou již nejsou embrya životaschopná je 37 °C. Základem našeho experimentu bylo získání několika revertovaných jedinců pro další analýzy, proto byla zvolena mírnější teplota inkubace ve snaze vyhnout se možné letalitě embryí i vylíhlých jedinců právě v důsledku působení extrémní teploty během zárodečného vývoje. Na počátku pokusu jsme inkubovali při 35 °C. Po vylíhnutí byli jedinci utraceni a vypreparované gonády použity pro histologické ověření reverze (viz dále). V druhé část experimentu, kdy jsme již měli histologicky potvrzenou reverzi z 35 °C, jsme inkubační teplotu zvýšili na 35,5 °C pro zvýšení šancí na odchování revertovaných jedinců. Kontrolní skupiny inkubované při 28 °C (běžná inkubační teplota bez vlivu na pohlaví (např. Quinn et al. 2007)) byly odděleny jen u prvních snůšek obou samic. Dále byla všechna vejce použita v experimentální teplotě pro zvýšení počtu revertovatelných jedinců a tedy i získaných revertantů.

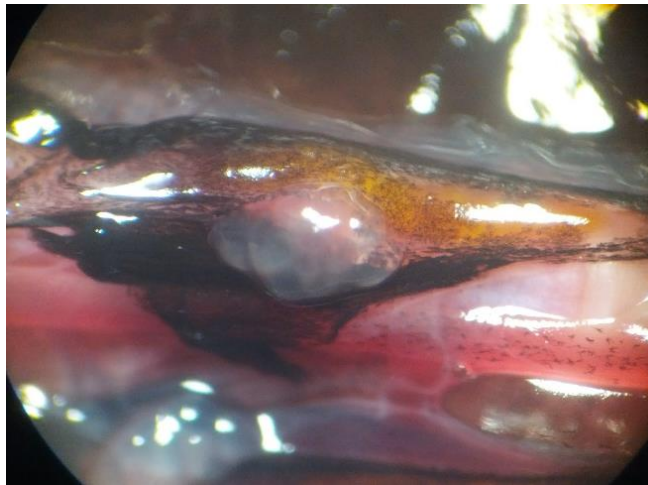
4.2 HORMONÁLNÍ OŠETŘENÍ

Roztok estradiolu (E2) byl aplikován na vrcholek ležících vajec. Na rozdíl od vajec inkubovaných při vysokých teplotách tyto vejce musela být z vrchu odhalena k umožnění přístupu pipet s funkční látkou. Jako rozpouštědlo byl zvolen čistý líh pro jeho skvělé vlastnosti týkající se nejen rozpustnosti E2, ale také rychlému odparu z povrchu vejce a tedy neomezovanému prostupování plynů skrz skořápku. Tohoto by v případě oleje jako rozpouštědla nebylo dosaženo, což by mohlo zapříčinit negativní vývoj embrya. Každá snůška byla rozdělena do skupiny experimentální (E2) a kontrolní (líh) přibližně v poměru 2:1. Kontrolní skupina sloužila především k ověření nezávadnosti lihu v případě velké úmrtnosti či při jiných nepředvídatelných komplikacích. Obě skupiny byly inkubovány v neutrálních 28 °C.

Průměrná doba inkubace při 28 °C je 11 týdnů (může se lišit o několik dní). Aplikace byla započata po dvou týdnech od vykladení samice. Dalších sedm týdnů byl jednou týdně v rámci 30 minut na vejce aplikován buď E2 nebo čisté rozpouštědlo. Poslední dva týdny inkubace byla vejce ponechána v klidu a očekávalo se líhnutí. Aplikace v podobě sedmi stejných dávek hormonu, byla zvolena na základě rozdílnosti želvích (obsahující vrstvu bílku) a agamích (neoddělený žloutek a bílek) vajec. Ve studii Freedberg et al. (2006) bylo reverze pohlaví u želv docíleno použitím jediné silné dávky hormonu (až 110µg). V případě agam to nepřipadalo v úvahu pro nepřítomnost bílku, jakožto stabilizačního a dávkovacího aparátu. Hormon by přes skořápku přecházel přímo do žloutku a vysoké dávky by mohly být pro embryo letální. Dávka byla zvolena podle práce zabývající se reverzí scinka *Bassiana duperreyi*, kde bylo jednorázově aplikováno množství 5µg E2 (Radder et al. 2008). Při vyšší váze agamích vajec jsme na vejce aplikovali E2 opakovaně. Na každé vejce bylo aplikováno 5µl roztoku E2 o koncentraci 1g/l každý ze sedmi týdnů. Dohromady tedy 35µg E2 na vejce. Cílem naší metody aplikace hormonu, byla nízká hodnota jedné dávky, avšak konečný součet aplikovaného hormonu velký. Kontrolní skupiny byly kapány totožně 5µl po sedm týdnů, avšak jen čistým lihem. K přípravě roztoku E2 byly použity automatické pipety, standardní laboratorní váhy s rozlišením 0,001g a vortex. Vzhledem k citlivosti vah byl roztok namíchán v nadbytku pro dosažení přesné koncentrace. Při manipulaci s hormonem bylo vzhledem k jeho zdravotní závadnosti použito ochranné roušky, laboratorního pláště a latexových rukavic.

4.3 PITVY

Do 14 dnů po vylíhnutí byli určití pokusní jedinci utraceni dekapitací, což je považováno za nejrychlejší a nejšetnější metodu usmrcení plazů. Za několika minut po usmrcení byl proveden podélný řez na břišní straně chirurgicky, byly vyjmuty gonády (Obr. 4) a následně každá zvlášť uloženy do 4% roztoku paraformaldehydu, v němž byly zakonzervovány a skladovány do doby histologického zpracování. Během pitvy byla také odebrána a do lihu uložena tkáň k izolaci DNA a následnému genetickému testu pohlaví pomocí metody PCR (viz dále). Ostatní pozůstatky byly popsány, zaevidovány a uloženy v mrazicí jednotce pro případné další využití.



Obr. 4 Samčí gonáda, světlý hrozen uprostřed

4.4 HISTOLOGIE

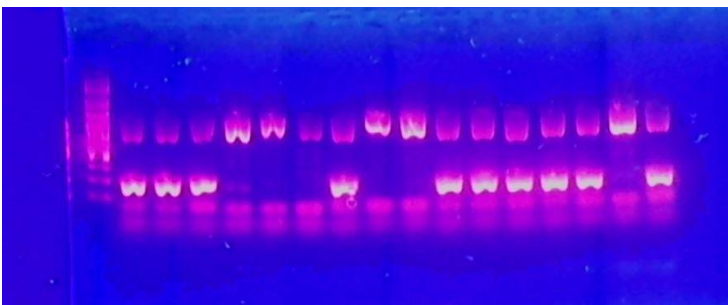
Histologické preparáty gonád (vždy jen jedna, levá či pravá) byly připraveny společností Biolab s.r.o. – tkáň byla zalita do parafinu, nabarvena eosinem a hematoxilinem a následně standardně nařezána k mikroskopování. Takto zpracované vzorky byly nafoceny pod mikroskopem při 200x a 400x zvětšení a odeslány k osexování zkušenému veterinárnímu histologovi MUDr. Tarasu Ardanovi, Ph.D.

4.5 PCR

Při určení genotypového pohlaví bylo postupováno podle metody Quinna et al. (2010). Tato metoda spočívá v použití duplexní PCR, při které jeden pár primerů amplifikuje 224 bp dlouhý fragment specifický pro chromozom W, zatímco druhý pár primerů amplifikuje 963 bp dlouhý kontrolní fragment, který je přítomen u obou pohlaví. Genotypické pohlaví se určí na základě

přítomnosti či nepřítomnosti proužku odpovídajícímu 224 bp na gelu po elektroforéze, přičemž přítomnost proužku značí genotypovou samici (ZW) a nepřítomnost genotypového samce (ZZ), viz Obr. 5.

Na izolaci DNA byla použita špička ocásku odebrána jedincům v raném věku. Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Blood & Tissue kitu (Qiagen). Reakční podmínky pro PCR a sekvence specifických primerů jsou uvedeny v Quinn et al. (2010). Elektroforéza byla provedena na 2% agarózovém gelu.



Obr. 5 Elektroforéza PCR

Horní řádek značí přítomnost 963 bp fragmentu společného pro obě pohlaví. Spodní řádek značí přítomnost 224 bp fragmentu typického pro W.

4.6 OPERACE

Operace byla provedena pro potvrzení reverze u jedinců s genotypem ZZ, avšak bez viditelných známek samčích pohlavně specifických znaků, což jsou především zvětšené hemipenisy u kořene ocasu (viz Obr. 6 a 7). Zvířatům byla podána anestezie, obdobně jako v práci Kubička et al. 2012, v podobě kombinace injekčně podaného ketaminu a tzv. ledování (chlazení jedince drceným ledem). Je to způsob kombinující šetrnost ledování a účinnost ketaminu. Zvířatům bylo podáno 130 μ g/g ketaminu na gram zvířete, rozděleno do dvou dávek, jedna před a druhá po 15 min ledování. Ketamin byl vpraven do stehenních svalů. V případě potřeby během operace byla přidána ještě pětina původně podané dávky. Během operace byla hlava zakryta ledem pro udržení anestezie (viz obr. 8). Řez byl proveden vertikálně uprostřed na pravé straně břišní dutiny. Po nafocení gonády bylo zvíře zašito a jizva přelepena tkáňovým lepidlem pro zamezení infekce. Úplné probuzení nastalo do tří hodin po operaci. Operace trvala asi 40 minut. Po 14 dnech v izolaci v prostředí bez ostrého a tvrdého podkladu byly bez jakýchkoli komplikací zvířatům odstraněny stehy a rána znovu přelepena tkáňovým lepidlem. Po dalších několika dnech byla navracena do normální ubikace avšak nadále sledována pro případ otevření či zahnisání rány. Po operaci byla zvířata krmena střídmě a bylo zabráněno styku rány s vodou.



Obr. 6 Bouličky hemipenisů na kořeni ocasu nejsou - samice



Obr. 7 Bouličky hemipenisů na kořeni ocasu jsou zřetelné - samec



Obr. 8 Pořízeno během operace ve fázi šití. Patrná anestezie tzv. ledováním

4.7 MODELOVÝ DRUH A JEHO CHOV

Akrodontní šupinatý ještěr, agama vousatá (*Pogona vitticeps*), který byl v této práci studován, patří do čeledi Agamidae. Jedná se o středně velké zvíře dosahující v zajetí délky až 22 cm (*snout-vent length*, SVL) a váhy až 550 g (Tamukai et al. 2011). Tyto agamy jsou u nás běžně chovaným terarijním zvířetem a v zájmových chovech bylo vyšlechtěno nespočet variant lišících se zbarvením nebo mírou ošupení. Jako diurnální druh australských pouští a polopouští je závislá na dostatku UVB záření, které je dodáváno pomocí zářivek či výbojek se speciálně upraveným spektrem. Absence UVB záření v chovných ubikacích vede k nedostatečné syntéze vitamínu D₃, což se posléze projevuje poruchou růstu kostí a následným onemocněním zvaným křivice postihující nejčastěji ocas (Oonincx et al. 2010). Agamy jsou vcelku společenská zvířata a kolikrát se navzájem v jednom teráriu tolerují i samci. Mezi dospělými jedinci je však vždy určitá hierarchie, která je mnohdy upevňována menšími šarvátkami. Tento druh má velice

širokou paletu toho, co jsou schopni pozřít a po čem útočí, vlastních mláďat nevyjímaje. Tomu se musí přizpůsobit i uspořádání terárií v chovu. Ideálním řešením teploty v teráriu je teplotní gradient od pokojových teplot až k teplotám blížících se 50 °C pod výhřevným zařízením.

Naše rodičovská populace byla složena původně ze dvou samic a jednoho samce. Posléze byla rozšířena o další dvě samice a jednoho samce. Vzhledem k možnosti obou samců pářit samice ve společném teráriu, byla zaznamenávána pouze maternita. Samicím bylo umožněno naklást snůšku v klidu mimo běžnou ubikaci s ostatními zvířaty. K dispozici měly plastovou nádobu o velikosti 50 x 75 cm s výškou substrátu až 20 cm. Substrát byl směsicí písku a zahradnické zeminy zajišťující optimální podmínky v kladišti. Substrát byl před použitím samicí navlhčen a upraven k usnadnění hrabání děr. Vejce byla snesena do týdne od počátku hrabání samice, jen výjimečně déle (pozdě snesená z experimentu vyloučena z důvodu možného posunutí doby inkubace). Do 24 hodin po vykladení samice byla vejce uložena do patřičně vlhkého lignocelu a posléze umístěna do inkubátoru s potřebným teplotním režimem (28 °C, 35 °C či 35,5 °C). Mechanicky poškozená či neoplozená vejce byla z pokusu také vyřazena. Takových vajec nebývá standardně mnoho, proto pokud počet takovýchto vajec přesáhl 40 % celkové velikosti snůšky, snůška nebyla dále při výzkumu žádoucí a byla vyřazena. Velikost snůšky záleží především na velikosti a tedy i stáří samice. Dále zde může hrát roli zdravotní stav samice či vyčerpání na konci sezóny. U mladších/menších samic se velikost snůšky pohybuje mezi 13 - 20 vejci. U starší/větších je to v jedné snůšce až 30 vajec.

Mláďata několik dní po líhnutí mají viditelný žloutkový vak, který je časem zatažen do břišní dutiny, popřípadě seschlý zbytek odpadne. V tomto období ještě většinou nejeví známky zájmu o potravu. Potrava je jim nabídnuta asi 3. den života zprvu v malých dávkách a v podobě menších cvrčků. Mezi málo žravými a rostoucími mláďaty bývají výjimky, které jsou naopak hodně žravá a rychle rostoucí. Tyto jedince je třeba časem oddělit od ostatních menších jedinců, aby je neutlačovali. Žravá mláďata dorůstají plné velikosti častokrát už po prvních šesti měsících, kdežto málo žravá mnohdy až po roce či později.

Krmeno bylo krmným hmyzem, převážně cvrčky popřípadě šváby, které agamy preferují a jsou tak vhodné pro rozkrmení mláďat. Krmný hmyz byl poprašován vitamínovou směsí Roboran H a v teráriu byl k dispozici vápník v podobě sépiové kosti. Od dvou týdnů věku, kdy se začínají všimnout zelené stravy, jim byla často dodávána v podobě venku trhaného

jetele či pampelišek. Výjimečně, především v zimních měsících, byla podávána strouhaná mrkev či jiná zelenina. Voda byla k dispozici *ad libitum*.

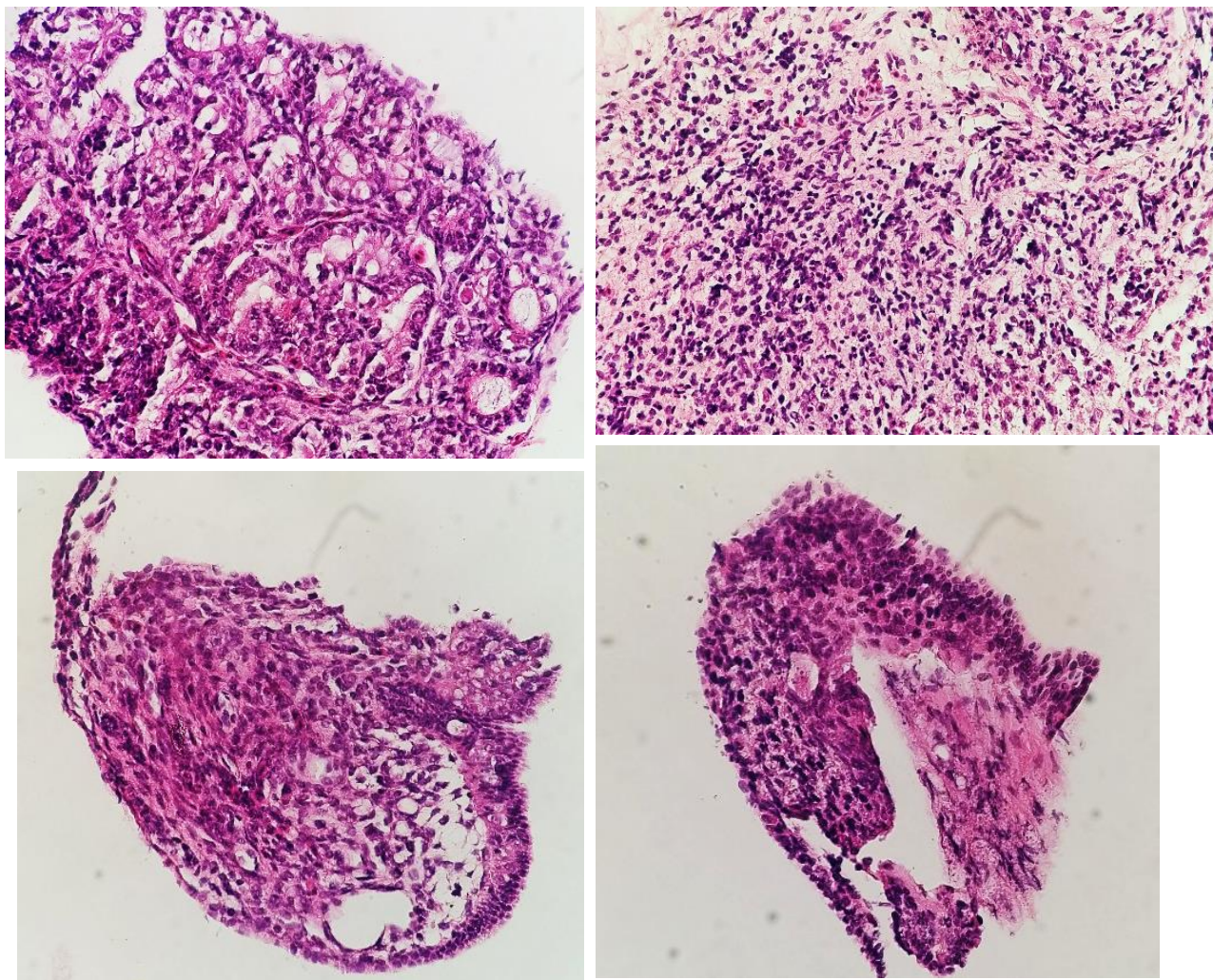
5 VÝSLEDKY

5.1 KONTROLA GENOTYPOVÉHO URČENÍ POHLAVÍ

K identifikaci reverze pohlaví je zásadní jednoznačné určení pohlaví dle genotypu a fenotypu jedinců. Jistoty správného určení genotypového pohlaví pomocí PCR nás vedou kontrolní jedinci. Genotypové pohlaví prokázané PCR testem se shodovalo s fenotypem celkem u 15 z 15 kontrolních jedinců, jimž byly morfologicky a některým i histologicky vyšetřeny odebrané gonády. Dalších 8 z 8 jedinců odchovaných téměř do jednoho roku, mělo dokonalou shodu ve fenotypovém a genotypovém pohlaví. Zde bylo pohlaví určováno především podle přítomnosti hemipenisů, ale i podle vzorců chování. Také kontroly u hormonálního experimentu měli dokonalý soulad genotypu a fenotypu.

5.2 HISTOLOGICKÉ POTVRZENÍ REVERZE

I přes některé nedostatky v histologickém zpracování vzorků bylo pohlaví prokazatelně určeno až na několik málo výjimek. Pokud byl vzorek opravdu špatný, byl vyloučen z analýzy. Histologickým vyšetřením gonád byla prokázána reverze pohlaví v obou ošetřeních. Ze sedmi genetických, ve vysoké teplotě (35 °C) inkubovaných samců byli histologicky potvrzeny tři revertovaní jedinci. U hormonálního experimentu byl poměr revertovaných jedinců vyšší. Zde bylo z šesti E2 kapáných jedinců se samčím genotypem pět revertovaných (viz Tab. 1). Tento postřeh však není prokazatelný vzhledem k nenáhodnému výběru gonád pro histologii a vzhledem k malým číslům. Nařezány byly i gonády genotypových samic z obou ošetření, u všech bylo pohlaví souhlasné a ani kontrolní skupina ošetřená pouze lihem dle očekávání nepřinesla žádnou reverzi (Obr. 9).



Obr. 9 Ukázka histologických řezů focených pod mikroskopem při zvětšení 400x. Vpravo nahoře je kontrolní samec (ZZ) a vlevo nahoře kontrolní samice (ZW). Dole jsou genotypoví samci revertovaní na fenotypové samice (ZZ), vpravo vysokou teplotou, vlevo estradiolem.

Tab. 1 Ilustrativní tabulka ukazující jedince s nesouhlasným pohlavím (vyznačení tučně)

35°C			E2	
geneticky	histologicky		geneticky	histologicky
M	M		M	F
F	F		M	F
M	M		F	F
M	M		M	F
M	F		M	F
M	F		F	F
M	F		M	F
F	F		M	M
F	F			
M	M			

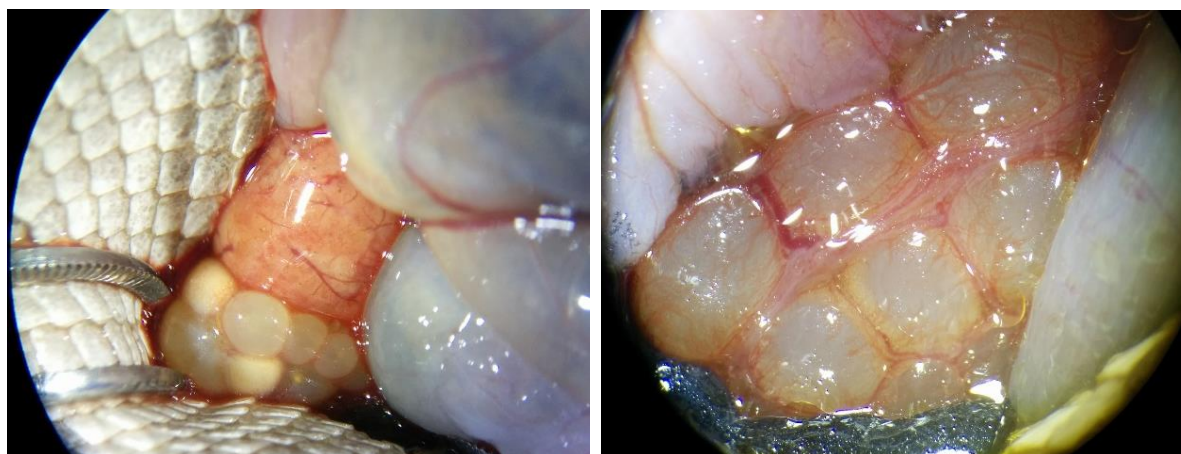
5.3 ODCHOV TEPLOTNĚ REVERTOVANÝCH JEDINCŮ

Z prvních pokusů odchovat teplotně revertované jedince se nám bohužel z neznámých důvodů nepodařilo žádného takového jedince získat (pravděpodobně souhra náhod v malých číslech), a to i přes to, že se nám později v dalších snůškách existence revertovaných jedinců u tohoto ošetření histologicky potvrdila. Z časových a technických důvodů (např. opožděná sezóna samic) se nám odchov teplotních revertantů nepodařilo včas zcela zopakovat a potvrdit získání revertovaných jedinců. Ze tří takto inkubovaných snůšek, a dohromady z 51 vylíhnutých jedinců, zatím po více jak 2 měsících prosperuje 37 geneticky určených mlád'at. S šancí 50:50 na genotypové samce, u kterých by mohla být reverze na samice, doufáme, že k reverzi došlo a my budeme moci dále zkoumat jejich fertilitu a fenotyp.

5.4 HORMONÁLNÍ ODCHOVY

Hormonálně kapáných snůšek bylo celkem pět. První tři od různých samic kapané přibližně zároveň, dohromady čítaly 28 hormonálně a 20 kontrolně kapáných vajec. Z toho se vyvinulo 19 hormonálně ošetřených a 13 kontrolních jedinců. Dlouhodobě (do dospělosti) přežili však jen 3 E2 a 2 kontrolní jedinci. Původně jsme vysokou úmrtnost přisuzovali špatným snůškám (poslední snůšky sezóny), avšak následující dvě snůšky, které byly naopak jedny z prvních v sezóně, nedopadly o moc lépe. Z 29 E2 a 16 kontrolně kapáných vajec se vylíhlo 23 E2 a 10 kontrolních jedinců. Po téměř dvou měsících přežilo už jen 13 E2 a 6 kontrolních jedinců.

I přes vysokou úmrtnost tohoto ošetření se nám podařilo odchovat dva revertované jedince z prvních snůšek a odhadujeme minimálně dva další z druhé várky. Revertanti byli nejprve vytipováni po genotypovém určení pohlaví, dle absence zvětšených hemipenisů a ve věku jednoho roku podstoupili operativní inspekci gonád (viz obr.10). Vzhledem k jejich věku a morfologicky dobře vyvíjejícím se ováriím, očekáváme každým okamžikem náznak připravované snůšky. Nerevertované sestry těchto samců, jedna z E2 a druhá kontrolní, již každá nakladla snůšku. Vejce se bohužel nedochovala, vzhledem k nezkušenosti mladých samic s kladením došlo k poničení celé snůšky. Ačkoliv se zatím jedná o malý vzorek a prozatím není ani potvrzené, zda se embrya budou vyvíjet normálně, zdá se, že na tyto dvě genotypové samice nemělo kapání E2 ani lihu sterilizující vliv.



Obr. 10 Vyfocená ovária revertovaných samic s dobře viditelnými folikuly.

6 DISKUSE

6.1 ZHODNOCENÍ PRÁCE

Přestože byl projekt dosti závislý na biorytmech rodičovských zvířat a na přežívání mláďat, povedlo se získat zajímavé výsledky. Povedlo se splnit téměř všechna předsevzetí, především otestovat existenci reverze a její stálost, a zbylá předsevzetí budou snad brzy doplněna (fertilita revertovaných samic). V záloze zůstaly možnosti, které jsme šetřili pro případ potřeby. Například nebýt určení pohlaví odborníky na histologické preparáty, bylo v záloze využití imunohistochemie. Preparáty by byly ošetřeny protilátkami k označení proteinu Sox9, který je zásadní pro vývoj varlat a také se podílí při blokaci vývoje vaječníků. Sox9 by se měl nalézat především v Sertoliho buňkách (Chaboissier et al. 2004). Jejich zvýraznění by umožnilo dále již snadné určení pohlaví jednotlivých gonád i bez znalosti gonadální histologie. Této metody nebylo využito především z časových, ale také finančních důvodů. Ohledně hormonálních ošetření je potřeba podotknout, že pokud by se hned první provedení neosvědčilo, bylo by dále hledáno řešení lepší. Dávky hormonu by byly buď zvedány, nebo snižovány podle nepřítomnosti reverze nebo nízké líhivosti a nadměrné úmrtnosti embryí.

Obě použité metody reverze pohlaví, které byly na tomto druhu agamy použity, se ukázaly funkční. Díky histologickému vyšetření gonád a genotypovému osexování bylo věrohodně prokázáno, že se opravdu jedná o jedince s nesouhlasným pohlavím. Podařilo se hormonálně indukované revertanty odchovat do pohlavní zralosti a potvrdit tak stálost této reverze. Perzistence teplotní reverze se dá odvodit ze stálosti hormonální, avšak potvrdit se jí v této práci již nepodařilo. Také se nepodařilo ověřit plodnost revertovaných jedinců.

6.2 CO ZJISTILI JINÍ A NA CO POUKAZUJÍ

Recentní práce, zabývající se téměř totožným tématem, však potvrdila nejen stálost teplotní reverze, ale i plodnost těchto revertantů a především získala prvenství v nalezení revertovaných jedinců tohoto druhu i ve volné přírodě (Holleley et al. 2015). Práce odhaluje několik velice zajímavých jevů. Nejen, že je teplotní reverze stálá a ZZ samice jsou plodné, ale dokonce se ukázalo, že mají vyšší průměrnou sezonní produkci vajec než ZW samice a to téměř dvojnásobnou. Dále uvádí, že potomky revertovaných jedinců lze revertovat o něco snáze (pokles zlomové teploty na 33,5 °C oproti původním 34,7 °C). I když nesignifikantní, přesto

zajímavý trend je každoročně narůstající poměr ZZ samic v populaci. Také se zmiňuje o jedné ZZ samici, jejíž potomci si všichni zachovali fenotyp samců i při vysokých inkubačních teplotách.

Autoři této práce ve svých objevech vidí potvrzení existence přechodu od GSD k TSD. Poukazují, že jejich výsledky podporují a jsou v souladu s klasickým modelem (Charnov & Bull 1977), který předpokládá selekci favorizující ESD oproti GSD v případě, že inkubační teplota rozdílně ovlivňuje fitness samců a samic. Tento model byl již dříve testován prací na agamě s TSD, *Amphibolurus muricatus*, kde hormonálně indukovali jedince s opačným pohlavím, než se za dané inkubační teploty mělo vyvíjet, a porovnávali jejich fitness s normálně se vyvíjejícími jedinci (Warner & Shine 2008). Sníženou fitness u jedinců z nesouhlasných teplot mohly však indukovat i exogenně podané hormony. Je také otázkou, jak silnou selekci způsobí takto snížená fitness a zda by to vedlo ke vzniku TSD u druhu s dobře diferencovanými pohlavními chromozomy.

Dalším tématem, které autoři Holleley et al. (2015) diskutují, je možnost vymizení W chromozomu z populace. Říkají, že ke ztrátě W chromozomu mohou přispět tři procesy. Prvním je pozitivní selekce ZZ samic díky vyšší fertilitě. Druhým je efekt driftu, kdy bude díky se zvyšujícímu se zastoupení ZZ samic W chromosom postupně vytlačen, čemuž by mohl nasvědčovat výše zmíněný trend narůstajícího poměru takovýchto samic v populaci. Třetím je dle nich Fisherovská frekvenčně závislá selekce. V principu jsou zvýhodněni jedinci produkující větší poměr v populaci méně zastoupeného pohlaví. Při stoupajícím počtu samic budou zvýhodněny ty matky, které by produkovaly více synů. To znamená, že samice produkující například 75 % samic (50 % ZW + 25 % ZZ) a pouze 25 % samců budou znevýhodněny. Frekvence výskytu jednotlivých chromozomů v populaci během let by mohla být velice zajímavou dynamickou záležitostí.

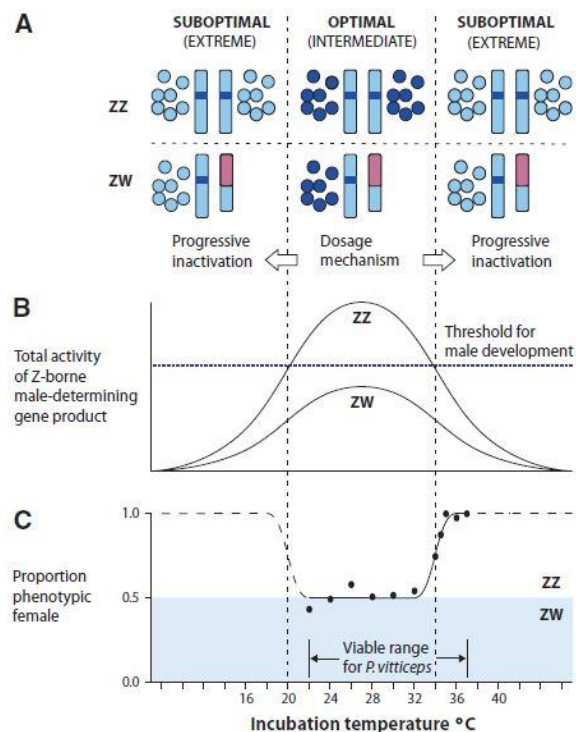
Nakonec zmiňují také to, že populace založená ZZ samci a ZZ samicemi má určení pohlaví neodlišitelné od klasického TSD, kde se při nízkých teplotách líhne 100 % samců a při vysokých 100 % samic. Všechny tyto skutečnosti nás vedou k zamyšlení nad evolucí TSD a GSD a jejich společnému výskytu u tohoto akrodontního ještěra.

6.3 *P. vitticeps*: VÝJIMKA ČI PRAVIDLO?

Quinn et al.(2007) vidí chromozom W jako Z bez genů nezbytných pro vývoj samců. Uplatňuje se zde podle nich princip genové dávky, kdy při vysokých teplotách chromozom Z ztrácí svou maskulinizující funkci. Chromozom W však tyto geny vůbec nemá a tedy v genotypu ZW není potřebná genová dávka k vývoji samčího pohlaví (viz Obr. 11). Můžeme spekulovat o tom, že evoluce chromozomu W umožnila původnímu druhu s TSD produkovat samice i tam, kde nebyla vysoká teplota pro jejich indukci. To znamená, že chromozom W by zajišťoval vyrovnaný poměr pohlaví v teplotách nižších, než na které byl původní TSD systém adaptovaný a kde by se líhlo 100 % samců. Co se týče zvýšené plodnosti ZZ samic, dala by se vysvětlit dvojnásobnou genovou dávkou Z chromozomu. Genotyp ZW má sice dostatečnou genovou dávku pro vývoj samic, ale nemusí být pro samice úplně ideální. Tohoto ideálu je však dosaženo v ZZ samici, kde je vývoj samce inhibován teplotou.

Obr. 11 Model mechanismu ZZ genové dávky navržený Quinn et al.(2007).

- A) Je zde vidět exprimovaný produkt determinačního genu s citlivostí na extrémní teploty. Inaktivovaný produkt nedokáže zapříčinit vývoj samčího pohlaví a vyvine se pohlaví samičí. Stejně tak z ZW genotypu se vyvine samice, tentokrát však z nedostatku tohoto teplotně labilního produktu.
- B) Zobrazení množství teplotně labilního produktu a jeho aktivity v různých podmínkách.
- C) Na výše popsaném mechanismu závislý poměr pohlaví napříč viabilním rozmezím.



Vytvoření chromozomu W by tedy byla jedna ze dvou možností jak zachovat vyrovnaný poměr pohlaví. Druhým by byl adaptivní posun zlomové teploty do nižších teplot, který by však v případě větších změn musel být značný a tedy ne zcela snadný. Přece jen určitý posun ve zlomové teplotě u *P. vitticeps* vidíme právě u potomků ZZ samic, kteří jsou o něco

snáze revertovatelní. U jiného druhu agamy, *Calotes versicolor*, se vyskytuje řešení, které se takovýmto značným posunům zlomové teploty vyhne vytvořením vícera zlomových teplot. Doddamani et al. (2011) popsali u této agamy zcela nový typ TSD, tentokrát se jedná o typ se třemi zlomovými teplotami (typ *female-male-female-male*). Sami autoři říkají, že by to mohla být adaptace k dosažení vyrovnaného poměru pohlaví v extrémních podmínkách.

Na základě těchto předpokladů a dále také na širokém rozšíření druhu lze usuzovat určitou evoluční historii determinace pohlaví. V oblastech s relativně nízkými inkubačními teplotami je pro vyrovnaný poměr pohlaví výhodné určení W chromozomem, kdežto v oblastech s relativně vysokými teplotami se tento W chromozom nevyplácí už jen kvůli horšímu reprodukčnímu fenotypu jeho nositelů, ale také kvůli vychýlenému poměru pohlaví. Dá se tedy předpokládat jeho udržení v některých populacích a jeho tok do populací jiných, kde by se jinak nevyskytoval. Tato představa může být dále rozšířena o klimatické změny, o kterých se v posledních desetiletích vedou vášnivé debaty (Gibbon et al. 2000). Za zamyšlení stojí i to, jak je fenomén revertantů u tohoto druhu starý. V prvním výše popsaném případě může být hodně starý a přetrvávat dlouhodobě. Další dlouhodobou možností, která by připadala v úvahu je odezva na střídající se doby ledové a meziledové, kdy reverze umožňuje vyrovnat se změnami klimatu a produkovat vždy vyrovnaný poměr pohlaví. Určitým vysvětlením výskytu revertovaných jedinců by také mohla být relativně recentní adaptace, způsobující lepší přežívání jedinců ve vysokých teplotách, které mohly být dříve letální. Tato mutace mohla odemknout dříve zamčené dveře vedoucí přes reverzi k TSD. Takovýchto možností lze namodelovat pravděpodobně více, otázkou však zůstává, jak bychom je měli testovat, či jak získat další data, která nám napomůžou při testování těchto hypotéz.

Když to shrneme, je možné, že chromozom W je jakýmsi výdobytkem evoluce, který umožňuje druhu s TSD osídlení oblastí, které byly dříve mimo jeho dosah. Podle této hypotézy jsou pohlavní reverze přece jen stále zajímavé, avšak nedají se aplikovat v širokém měřítku, ale spíše na jednotlivé druhy či skupiny. Celý tento princip by se možná dal aplikovat i na scinka *Bassiana duperreyi*, druh se systémem XX/XY, kde byly taky prokázány teplotní reverze pohlaví (Rhen et al. 2008). U tohoto horského druhu by se mohlo jednat například o adaptaci pro osídlení vyšších nadmořských výšek.

Někteří autoři se domnívají, že potvrzení funkční reverze u tohoto i jiných druhů potvrzuje možnost systému GSD k přechodu směrem k TSD (Holleley et al. 2015, Quinn et al

2007). Spatřují v reverzi podporu pro své tvrzení, že plazi jsou schopni pod vlivem klimatických změn přejít nazpět k TSD, které má v těchto podmínkách určité výhody a že záleží hlavně na výhodnosti pro nositele. Uvažují tedy nad tím, jak důležitým prvkem zpětný přechod k TSD je (Holleley et al. 2015). Acrodonta se však od dalších linií dosti liší, co se týče determinace pohlaví a stálosti pohlavních chromozomů napříč jejími větvemi. U agam, gekonů a pravděpodobně i scinků se GSD objevilo znatelně později, alespoň to diskutují autoři práce, která se zabývá popisem dosud neznámých chromozomů především u gekonů (Gamble et al. 2015). Ve své práci oznamují odhalení až 17 různých přechodů mezi typy určení pohlaví, především od jednoho typu GSD k jinému. Nevylučují zde ani přechody zpět k TSD. Vinu přikládají právě skutečnosti, že je zde GSD jako takové mnohem mladší a zdá se, že méně stabilní než například u leguánů, ještěrek či hadů. Také se však přiklání k hypotéze GSD jako evoluční pasti (Pokorná & Kratochvíl 2009).

6.4 KUDY DÁL

Obecnost možnosti přechodu od GSD zpět k TSD u druhů s dobře vyvinutými a diferencovanými chromozomy by se dle nás měla testovat u druhů ze skupin s evolučně stabilním určením pohlaví, jako jsou například Iguania, Colubroidea, či Lacertidae (Pokorná & Kratochvíl 2009, Gamble et al. 2015). Vzhledem k možnému vymizení teplotní senzitivity determinační kaskády způsobené posunem teplot pro viabilitu a teplotní reverzi by mohla při testování dobře posloužit hormonální reverze. Existence a stálost takovéto reverze se nám podařilo potvrdit u *P. vitticeps* a byla také potvrzena u *Staurtypus triporcatus* a *salvinii*, želv s GSD (Freedberg et al. 2006) a scinka *Bassiana duperreyi* s XX/XY pohlavními chromozomy. Ani v jednom z těchto případů se však nejedná o druh ze skupiny s evolučně stabilním určením pohlaví (Pokorná & Kratochvíl 2009, Gamble et al. 2015), což dle našeho názoru je hlavní důvod, proč je reverze u těchto druhů vůbec možná a i pravděpodobně vede k zachování plodnosti revertovaných jedinců.

7 ZÁVĚR

Úspěšně se podařilo prokázat existenci pohlavních revertantů indukovaných vysokou teplotou i estradiolem. Trvalost reverze demonstrují dvě roční samice s genotypem ZZ. Zde sice neprokázána, avšak známá fertilita revertovaných samic vede mnohé k aplikování těchto poznatků na domněnky ohledně zpětným přechodům GSD k TSD. Poukazující na evidenci demonstrující stálost pohlavních chromozomů v mnohých skupinách i mezi plazi, stále se domníváme, že takovéto zpětné přechody nejsou možné u dobře diferencovaných chromozomů. Takovéto ojedinělé adaptivní přechody však nejsou vyloučeny i u některých jiných druhů především mezi agamami a gekony.

Námi navržené a použité dávkování hormonu estradiolu se ukázalo jako úspěšné a s malými úpravami by se dalo použít i na jiné druhy. Vhodné by takto otestovat větší množství druhů převážně ze skupin se stabilními pohlavními chromozomy, kuli další evidenci podporující jednu či druhou hypotézu. Takovéto otestování reverze by bylo vhodné i u dalších příbuzných druhů rodu *Pogona*, pro lepší pochopení tohoto fenoménu.

8 LITERATURA

1. Arnold, F. & Kuo, E. C. Y. The Value of Daughters and sons : A comparative Study of the Gender Preferences of Parents. *J. Comp. Fam. Stud.* **15**, 299–318 (1984).
2. Bell, L. R., Maine, E. M., Schedl, P. & Cline, T. W. Sex-lethal, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* **55**, 1037–1046 (1988).
3. Bishop, C. E. *et al.* A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* **26**, 490–494 (2000).
4. Bull, J. J., Vogt, R. C. & McCoy, C. J. Sex Determining Temperatures in Turtles: A Geographic Comparison. *Evolution (N. Y.)* **36**, 326–332 (1982).
5. Cui, S. *et al.* Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development* **131**, 4095–4105 (2004).
6. Doddamani, L. I. S., Vani, V. & Seshagiri, P. B. A tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*, exhibiting a potentially novel FMFM pattern of temperature-dependent sex determination. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* **317 A**, 32–46 (2012).
7. Ewert, M. a., Jackson, D. R. & Nelson, C. E. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *J. Exp. Zool.* **270**, 3–15 (1994).
8. Ezaz, T. *et al.* The ZW sex microchromosomes of an Australian dragon lizard share no homology with those of other reptiles or birds. *Chromosom. Res.* **17**, 965–973 (2009).
9. Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanovic, M., ... & Schafer, A. J. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525–529 (1994).
10. Fredga, K. in *Mechanisms of Gonadal Differentiation in Vertebrates SE - 4* 23–30 (Springer Berlin Heidelberg, 1983). doi:10.1007/978-3-642-69150-8_4
11. Freedberg, S., Bowden, R. M., Ewert, M. a, Sengelaub, D. R. & Nelson, C. E. Long-term sex reversal by oestradiol in amniotes with heteromorphic sex chromosomes. *Biol. Lett.* **2**, 378–381 (2006).
12. Gamble, T. A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sex. Dev.* **4**, 88–103 (2010).
13. Gamble, T. *et al.* Restriction Site-Associated DNA Sequencing (RAD-seq) Reveals an Extraordinary Number of Transitions among Gecko Sex-Determining Systems. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 1296–1309 (2015).

14. Garner, D. L. & Seidel, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* **69**, 886–895 (2008).
15. Gibbon, J. W. *et al.* The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. *Bioscience* **50**, 653 (2000).
16. Graves, J. M. a & Peichel, C. L. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol.* **11**, 205 (2010).
17. Hawkins, J. R. *et al.* Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum. Genet.* **88**, 471–474 (1992).
18. Holleley, C. E. *et al.* Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature* **523**, 79–82 (2015).
19. Hutton, J. M. Incubation temperatures, sex ratios and sex determination in a population of Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *J. Zool.* **211**, 143–155 (1987).
20. Chaboissier, M. C. *et al.* Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* **131**, 1891–1901 (2004).
21. Charlesworth, B. & Charlesworth, D. The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **355**, 1563–1572 (2000).
22. Charnov, E. L. & Bull, J. When is sex environmentally determined? *Nature* **266**, 828–830 (1977).
23. Iwata, E., Nagai, Y., Hyoudou, M. & Sasaki, H. Social Environment and Sex Differentiation in the False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zoolog. Sci.* **25**, 123–128 (2008).
24. King, M. & King, D. Chromosomal evolution in the lizard genus *Varanus* (reptilia). *Aust. J. Biol. Sci.* **28**, 89–108 (1975).
25. Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**, 117–121 (1991).
26. Koubová, M. *et al.* Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosom. Res.* **22**, 441–452 (2014).
27. Kubička, L., Golinski, A., John-Alder, H. & Kratochvíl, L. Ontogeny of pronounced female-biased sexual size dimorphism in the Malaysian cat gecko (*Aeluroscalabotes felinus*: Squamata: Eublepharidae): A test of the role of testosterone in growth regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **188**, 183–188 (2012).

28. Lang, J. W. & Andrews, H. V. Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *J. Exp. Zool.* **270**, 28–44 (1994).
29. Martinez, P. A., Ezaz, T., Valenzuela, N., Georges, A. & Graves, J. A. M. An XX / XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii* : A new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. 815–825 (2008). doi:10.1007/s10577-008-1228-4
30. Matsubara, K. *et al.* Highly Differentiated ZW Sex Microchromosomes in the Australian Varanus Species Evolved through Rapid Amplification of Repetitive Sequences. **9**, 1–9 (2014).
31. Matsumoto, Y. & Crews, D. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **354**, 103–110 (2012).
32. Merchant-larios, H., Ruiz-ramirez, S., Moreno-mendoza, N. & Marmolejo-valencia, A. Correlation among Thermosensitive Period, Estradiol Response , and Gonad Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. **385**, 373–385 (1997).
33. Mitchell, N. J. *et al.* Support for a rare pattern of temperature-dependent sex determination in archaic reptiles: evidence from two species of tuatara (*Sphenodon*). *Front. Zool.* **3**, 9 (2006).
34. Mrosovsky, N. & Pieau, C. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia* **12**, 169–179 (1991).
35. Nei, M. Linkage modification and sex difference in recombination1. 681–699 (1969).
36. Olmo, E. & Signorino, G. No Title. *Chromorep: A reptile chromosomes database. Lacertidae* (2005). at <<http://chromorep.univpm.it/node/26>>
37. Oonincx, D. G. a B., Stevens, Y., van den Borne, J. J. G. C., van Leeuwen, J. P. T. M. & Hendriks, W. H. Effects of vitamin D3 supplementation and UVb exposure on the growth and plasma concentration of vitamin D3 metabolites in juvenile bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **156**, 122–128 (2010).
38. Pokorná, M., Rens, W., Rovatsos, M. & Kratochvíl, L. A ZZ/ZW Sex Chromosome System in the Thick-Tailed Gecko (*Underwoodisaurus milii*; Squamata: Gekkota: Carphodactylidae), a Member of the Ancient Gecko Lineage. *Cytogenet. Genome Res.* **142**, 190–196 (2014).
39. Pokorná, M. J. & Kratochvíl, L. What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates ? *Biol. Reviews* (2014). doi:10.1111/brv.12156

40. Pokorná, M. J., Rovatsos, M. & Kratochvíl, L. Sex Chromosomes and karyotype of the (nearly) mythical creature, the Gila monster, *Heloderma suspectum* (Squamata: Helodermatidae). *PLoS One* **9**, 1–7 (2014).
41. Pokorná, M. & Kratochvíl, L. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: Are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zool. J. Linn. Soc.* **156**, 168–183 (2009).
42. Pokorná, M. *et al.* Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosom. Res.* **18**, 809–820 (2010).
43. Quinn, A. E., Ezaz, T., Sarre, S. D., Graves, J. M. & Georges, A. Extension, single-locus conversion and physical mapping of sex chromosome sequences identify the Z microchromosome and pseudo-autosomal region in a dragon lizard, *Pogona vitticeps*. *Heredity (Edinb)*. **104**, 410–417 (2010).
44. Quinn, A. E. *et al.* Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* **316**, 411 (2007).
45. Radder, R. S., Quinn, A. E., Georges, A., Sarre, S. D. & Shine, R. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol. Lett.* **4**, 176–178 (2008).
46. Rhen, T., Fagerlie, R., Schroeder, A., Crossley, D. A. & Lang, J. W. Molecular and morphological differentiation of testes and ovaries in relation to the thermosensitive period of gonad development in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Differentiation* 1–11 (2015). doi:10.1016/j.diff.2014.12.007
47. Rovatsos, M., Altmanová, M., Pokorná, M. J. & Kratochvíl, L. Novel X-linked genes revealed by quantitative polymerase chain reaction in the Green Anole, *Anolis carolinensis*. *G3 Genes, Genomes, Genet. Mission* **4**, 2107–2113 (2014).
48. Rovatsos, M., Altmanová, M., Pokorná, M. & Kratochvíl, L. Conserved sex chromosomes across adaptively radiated anolis lizards. *Evolution (N. Y)*. **68**, 2079–2085 (2014).
49. Rovatsos, M., Pokorná, M. J., Altmanová, M. & Kratochvíl, L. Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: Furcifer): differentiation of sex and neo-sex chromosomes. *Sci. Rep.* (2015).
50. Rovatsos, M. *et al.* Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biol. Lett.* 2013–2016 (2014).

51. Shetty, S., Griffin, D. K. & Graves, J. a M. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosom. Res.* **7**, 289–295 (1999).
52. Shoemaker, C. M. & Crews, D. Seminars in Cell & Developmental Biology Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. **20**, 293–303 (2009).
53. Schedl, T. & Kimble, J. fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **119**, 43–61 (1988).
54. Smith, C. A. *et al.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* **461**, 267–271 (2009).
55. Tamukai, K., Takami, Y., Akabane, Y., Kanazawa, Y. & Une, Y. Plasma biochemical reference values in clinically healthy captive bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and the effects of sex and season. **3**, 368–373 (2011).
56. Trník, M., Albrechtová, J. & Kratochvíl, L. Persistent effect of incubation temperature on stress-induced behavior in the Yucatan banded gecko (*Coleonyx elegans*). *J. Comp. Psychol.* **125**, 22–30 (2011).
57. Valenzuela, N. Temperature-dependent sex determination. *Reptil. incubation Environ. Evol. Behav.* 211–227 (2004). doi:10.1016/j.ygcen.2006.11.001
58. Viets, B. E., Tousignant, A., Ewert, M. A., Nelson, C. E. & Crews, D. Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Exp. Zool.* **265**, 679–683 (1993).
59. Warner, D. A. & Shine, R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature* **451**, 566–568 (2008).
60. Waters, P. D., Wallis, M. C. & Graves, J. a M. Mammalian sex-Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 389–400 (2007).
61. Wibbels, T., Bull, J. J. & Crews, D. Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *J. Exp. Zool.* **260**, 130–134 (1991).